

Царькова Александра Сергеевна

**Синтез люциферина люминесцентного червя *Fridericia heliota*  
и его аналогов**

специальность – 02.00.10 – биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва 2015

Работа выполнена в группе синтеза природных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

**Научный руководитель:**

Кандидат химических наук Илья Викторович Ямпольский

**Официальные оппоненты:**

Туманов Василий Викторович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории тонкого органического синтеза им. И.Н. Назарова Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук.

Юровская Марина Абрамовна, доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник Лаборатории биологически активных органических соединений, кафедры органической химии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН)

Защита состоится 16 декабря 2015 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и на сайте института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан

2015 г.

**Ученый секретарь  
диссертационного совета,**

**доктор физико-математических наук**



**В.А. Олейников**

## ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Билюминесценция – это явление излучения света живыми организмами. Основную роль в процессе билюминесценции играют фермент-люцифераза и субстрат, называемый люциферин, при окислении которого происходит образование оксилуциферина в возбужденном состоянии с последующим испусканием видимого света. По современным оценкам существует около 30 различных химических механизмов билюминесценции, однако на сегодняшний день известны структуры лишь семи природных люциферин, последняя из которых была расшифрована более 25 лет назад.

Явление билюминесценции находит сегодня широкое применение в различных областях для решения большого круга практических задач. В экологии эффект билюминесценции используется для мониторинга окружающей среды, в медицине - для проведения клинических анализов, в фармацевтике - для скрининга лекарственных кандидатов. В фундаментальных биохимических исследованиях билюминесценция применяется для визуализации физиологических процессов, происходящих в клетках и целых организмах, а также для определения различных аналитов, в первую очередь - АТФ, кальция, ферментов, антител, антигенов. На сегодняшний день одним из важнейших методов билюминесцентного анализа является билюминесцентный имиджинг (BLI) – технология неинвазивного мониторинга молекулярных и клеточных процессов *in vivo*, в клетках и целых животных.

Применение билюминесценции для исследования живых систем наложило множество ограничений на строение и свойства используемых веществ. В связи с этим, актуальным направлением исследований в области билюминесценции является поиск новых систем, которые можно использовать для визуализации и мониторинга процессов жизнедеятельности клеток и организмов.

**Цели и задачи исследования.** Целью настоящей работы было изучение компонентов билюминесцентной системы нового билюминесцентного вида почвенных кольчатых малощетинковых червей *Fridericia heliota*, установление структуры и синтез люциферина этой системы, а также установление структур и синтез ряда природных аналогов нового люциферина.

В рамках поставленной цели были сформулированы задачи:

- Разработать метод синтеза изомеров нового природного люциферина почвенного червя *Fridericia heliota*, структуры которых не противоречат ранее полученным спектральным данным. Синтезировать и изучить люминесцентную активность изомеров люциферина *Fridericia*.
- Разработать метод синтеза соединения CompX – природного аналога люциферина *Fridericia heliota*. Установить конфигурацию трехзамещенной двойной связи CompX.
- Разработать метод синтеза трипептида AsLn2 – природного аналога люциферина *Fridericia heliota*. Установить относительные и абсолютные конфигурации стереоцентров AsLn2.
- Разработать метод синтеза дипептида AsLn7 – природного аналога люциферина *Fridericia heliota*.

**Научная новизна и практическая ценность работы.** Впервые установлена структура и осуществлен полный синтез нового природного люциферина – субстрата уникальной биoluminesцентной системы почвенного червя *Fridericia heliota*. Разработаны методы синтеза ряда природных аналогов люциферина червя *F. heliota*: CompX - (Z)-5-(2-карбоксивинил)-2-гидроксибензойной кислоты), AsLn2 - (S)-2-амино-6-(5-((Z)-3-(((S)-1-карбоксивинил)этил)амино)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо) гексановой кислоты и AsLn7 - ((Z)-4-(5-(2-карбоксивинил)-2-гидроксибензамидо)бутановой кислоты. Новый люциферин почвенного червя *Fridericia heliota*, полученный в настоящей работе, и его аналоги могут найти применение в различных методах люминесцентного анализа.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- Люциферин червя *F. heliota* и его природные аналоги являются представителями нового класса модифицированных пептидов.
- Люциферин червя *F. heliota* представляет собой (S,Z)-6-(карбоксивинил)-2-(3-(3-((3-карбоксивинил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексановую кислоту.

**Апробация полученных данных и публикации.** Основные материалы диссертации были доложены на конкурсе молодых ученых в рамках XXVI Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2014), программе «Участник молодежного научно-инновационного конкурса 2014» («УМНИК») РАН (Москва 2014), а также на XVIII международном симпозиуме по биoluminesценции и хемилумinesценции (Уппсала, Швеция, 2014). По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах.

**Структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 123 страницах и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, благодарностей, списка сокращений и условных обозначений, а также списка цитируемой литературы, включающего 181 ссылку. Диссертация содержит 40 рисунков, 32 схемы и 10 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Обзор литературы** представлен в первой главе диссертации и включает в себя два раздела. Первый раздел посвящен описанию химических структур, механизмов реакции биолюминесценции и методов синтеза всех известных на сегодняшний день люциферинов. Второй раздел посвящен описанию синтетических аналогов D-люциферина и целентеразина, обладающих спектральными данными отличными от природных люциферинов.

**Экспериментальная часть** представлена в третьей главе диссертации и включает в себя описание методов синтеза веществ представленных в настоящей работе.

### **Выделение и очистка компонентов биолюминесцентной системы почвенного червя *Fridericia heliota*.**

Долгое время существовала общая концепция о единой природе люминесценции почвенных червей (олигохет), основанная на результатах сравнительных исследований физиологии и биохимии 12 видов, относящихся к 6 родам (*Diplocardia*, *Diplostrema*, *Fletcherodrilus*, *Octochaetus*, *Pontodrilus* и *Spenceriella*)<sup>1</sup>. Все эти биолюминесцентные олигохеты секретируют люминесцентную слизь, содержащую целомические клетки, в гранулах которых локализована люминесценция. Биолюминесценция олигохет характеризуется общим признаком - участием перекиси водорода. Люциферин червей вида *Diplocardia longa*, N-изовалерил-3-амино-1-пропаналь, выступает в качестве субстрата для люцифераз всех биолюминесцентных дождевых червей. Кроме того, люцифераза *D. longa* проявляет активность в перекрестных реакциях с люциферинами других червей<sup>2</sup>.

Изучаемый с середины XIX столетия феномен биолюминесценции почвенных червей из семейства энхитреид (*Enchytraeidae*), ограничивающийся исключительно родами *Henlea* и *Fridericia*, по сей день является малоизученным<sup>3</sup>.

Недавно в Сибири нашими коллегами из Красноярска: Валентином Петушковым и Натальей Родионовой - был обнаружен новый вид биолюминесцентных олигохет *Fridericia heliota* небольших (~ 15 мм в длину, 0,5 мм в диаметре и ~ 2 мг веса), бело-желтых червей, обитающих в лесной почве и испускающих синий свет ( $\lambda_{\max}$  люминесценции 478 нм) при механической стимуляции. Люминесценция *Fridericia heliota* локализована в эпидермальных клетках.<sup>4</sup>

В ходе дальнейшей работы данной группы было показано, что механизм биолюминесценции *F. heliota* является уникальным, так как люциферин и люцифераза этого червя не проявляют способность к перекрестной биолюминесценции с люциферазами или люциферинами других организмов.

<sup>1</sup> Wampler J.E., Jamieson B.G.M. Earthworm bioluminescence: Comparative physiology and biochemistry // *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 1980. Т. 66. № 1. С. 43–50.

<sup>2</sup> Ohtsuka H., Rudie N.G., Wampler J.E. Structural identification and synthesis of luciferin from the bioluminescent earthworm, *Diplocardia longa* // *Biochemistry.* 1976. Т. 15. № 5. С. 1001–1004.

<sup>3</sup> Rota E. Lights on the ground: A historical survey of light production in the Oligochaeta. // *Bioluminescence In Focus - A Collection of Illuminating Essays* / под ред. V.B. Meyer-Rochow. Kerala, India: Research Signpost, 2009.

<sup>4</sup> Rota E., Zalesskaja N.T., Rodionova N.S., Petushkov V.N. Redescription of *Fridericia heliota* (Annelida, Clitellata: Enchytraeidae), a luminous worm from the Siberian taiga, with a review of bioluminescence in the Oligochaeta // *J. Zool.* 2003. Т. 260. № 3. С. 291–299.

Люминесцентная система *F. heliota* включает 5 компонентов: люциферазу, люциферин, аденозин-5'-трифосфат (АТФ), ионы  $Mg^{2+}$  и кислород<sup>5,6</sup>.

Выделение и определение структуры люциферина червя *Fridericia heliota* было сильно затруднено чрезвычайно малым количеством биомассы червя (ручной сбор давал около 30 г в год) и низким содержанием люциферина (~0.1 мкг/г необработанной биомассы)<sup>7</sup>. В ходе многочисленных экспериментов, направленных на очистку люциферина *F. heliota*, Петушковым и сотр. были выделены вещества неустановленного состава, названные ComponentX (CompX), AsLn2 и AsLn7<sup>8</sup>. Эти соединения проявили хроматографическую подвижность и УФ-спектральные свойства аналогичные люциферину. Однако они не обладали люминесцентной активностью при смешивании с люциферазой червя *F. heliota* или другими известными люциферазами. Мы предположили, что эти соединения могут являться неактивными природными аналогами люциферина – его биосинтетическими предшественниками или продуктами деградации. Принимая во внимание чрезвычайно малую концентрацию люциферина, тогда как количество CompX более чем в десять раз превышало количество люциферина, мы пришли к выводу о необходимости в первую очередь определить структуру и синтезировать CompX.

---

<sup>5</sup> Petushkov V.N., Rodionova N.S., Bondar V.S. Study of the luminescence system of the soil enchytraeid *Fridericia heliota* (Annelida: Clitellata: Oligochaeta: Enchytraeidae). // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2003. Т. 391. С. 204–207.

<sup>6</sup> Rodionova N.S., Bondar V.S., Petushkov V.N. ATP is a cosubstrate of the luciferase of the earthworm *Fridericia heliota* (Annelida: Clitellata: Oligochaeta: Enchytraeidae). // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2003. Т. 392. С. 253–255.

<sup>7</sup> Petushkov V.N., Rodionova N.S. Purification and partial spectral characterization of a novel luciferin from the luminous enchytraeid *Fridericia heliota*. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2007. Т. 87. № 2. С. 130–136.

<sup>8</sup> Marques S.M., Petushkov V.N., Rodionova N.S., Esteves da Silva J.C.G. LC-MS and microscale NMR analysis of luciferin-related compounds from the bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2011. Т. 102. № 3. С. 218–223.

## 1. Синтез и свойства природного аналога люциферина CompX.

Мажорным компонентом низкомолекулярной люциферинового фракции экстракта биомассы червя *F. heliота* было соединение, названное нами CompX, которого оказалось в 30 раз больше люциферина (0.15 мг). Анализ спектров поглощения (Рис. 1а) полученного вещества позволил выявить рН-зависимость в области 2.8 ÷ 5.0, что позволило предположить наличие ионогенных групп с  $pK_a$  около 4.

Исследуемое соединение CompX обладало способностью к флуоресценции (Рис. 1b) с эмиссией ( $\lambda_{em}$ ) в синей области видимого спектра. Стоксов сдвиг CompX был достаточно велик как в кислой (150 нм), так и в щелочной (167 нм) средах, что позволило предположить сильную делокализацию электронов.

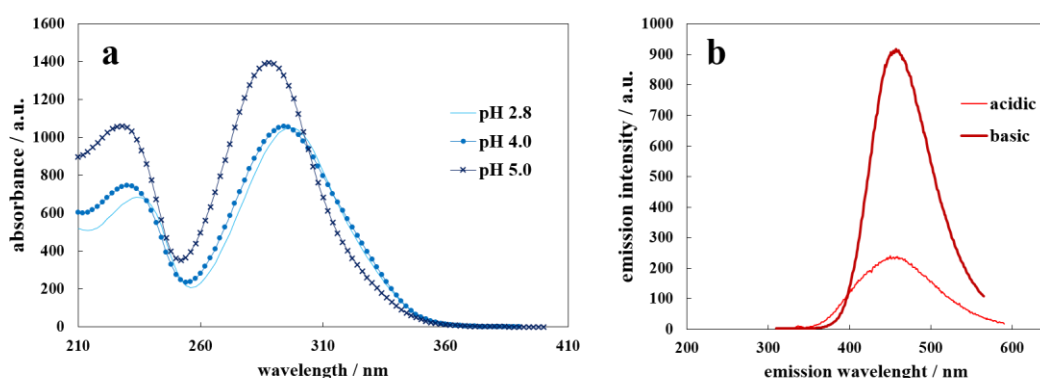
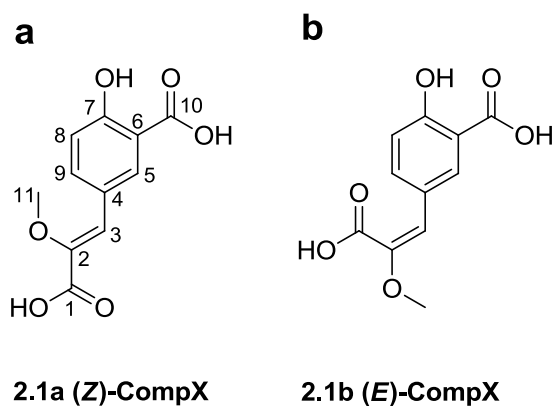


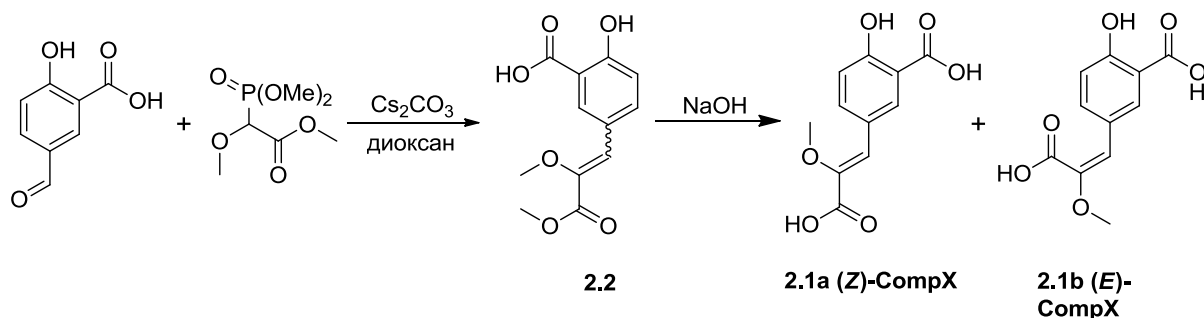
Рисунок 1. Спектры (а) абсорбции и (b) флуоресцентной эмиссии CompX при различных рН.

Масс-спектры высокого разрешения очищенного природного CompX выявили протонированный молекулярный ион с  $m/z$  239.0598, соответствующей молекулярной формулой к которому являлась  $C_{11}O_6H_{11}^+$  (расчетное  $m/z$  239.0550). В спектре  $^1H$  ЯМР CompX, полученном Максимом Дубинным (ИБХ РАН), наблюдались характерные пики трех протонов в ароматической области (Таблица 1): дублет с небольшой константой спин-спиновой взаимодействия (2.2 Гц, H5), дублет с большой константой (8.5 Гц, H8) и дублет дублетов (2.2 и 8.5 Гц, H9) с равными значениями интегралов. Такая картина характерна для трехзамещенного бензольного кольца, где два протона занимают соседнее положение, а третий находится в *meta*-положении к первому и *para*-положении ко второму протону. Также в спектре наблюдались слабополюсный синглет при 6.89 мд (один протон, C3) и метокси-группа (три протона, C11). Таким образом, в спектре  $^1H$  ЯМР наблюдались 7 из предполагаемых 10 протонов. Все одиннадцать атомов углерода давали сигналы в одно- и двумерных ЯМР спектрах  $^{13}C$ . Помимо 8 сигналов в слабом поле наблюдались 2 сигнала атомов углерода карбоксильных групп и 1 сигнал метокси-группы. Полученные данные ЯМР и масс-спектрометрии наилучшим образом согласовались со структурой 5-(2-карбокси-2-метоксивинил)-2-гидроксибензойной кислоты (Рис. 2а). Для определения конфигурации трехзамещенной двойной связи и подтверждения строения CompX нами были синтезированы оба пространственных изомера (*E* и *Z*).



**Рисунок 2.** Структуры CompX и его (*E*)-изомера. (а) Нумерация углеродов в CompX согласно Таблице 1. (b) Синтетический (*E*)-изомер CompX с противоположной конфигурацией C2-C3 двойной связи.

Ключевой стадией синтеза CompX являлась реакция олефинирования 5-формил-2-гидроксибензойной кислоты по Хорнеру-Водсворту-Эммонсу с использованием метил-2-(диметоксифосфонил)-2-метоксиацетата, позволившая получить оба изомера CompX в соотношении *Z:E* = 2:1 (Схема 1). Основной *Z*-изомер был идентичен природному образцу согласно ЯМР и УФ спектрам, тогда как минорный *E*-изомер обладал значимо отличными свойствами. Наиболее существенными отличиями явились химические сдвиги углерода C3 и соответствующего протона ( $\Delta$  18.2 и 0.93 м.д., соответственно, Таблица 1). Стоит отметить также, что изомер CompX с неприродной конфигурацией двойной связи не обладал флуоресцентными свойствами.



**Схема 1.** Синтез CompX и его *E*-изомера.

Мы предположили, что в природе CompX, возможно, синтезируется из тирозина в результате трех модификаций: дезаминирования до кетокислоты, *O*-метилирования енолята и карбоксилирования в орто-положение к фенольному гидроксиду. Дальнейшие эксперименты ЯМР свидетельствовали о том, что замещенный CompX является структурным фрагментом люциферина *F. heliota*. В <sup>1</sup>H ЯМР спектре люциферина *F. heliota* был обнаружен такой же паттерн сигналов ароматических протонов, что и в спектрах CompX. Мы обнаружили, что характерные сигналы протонов CompX наблюдаются также в спектрах других аналогов люциферина.



**Таблица 1.  $^1\text{H}$  (800 МГц) и  $^{13}\text{C}$  (200 МГц) химические сдвиги и мультиплетности сигналов протонов CompX и его синтетического аналога (*E*)-изомера CompX ( $\text{D}_2\text{O}$ , pH 4.2).**

Нумерация атомов углерода	CompX		<i>(E)</i> -изомер CompX	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	-	170.4	-	171.0
2	-	146.5	-	151.1
3	6.89 (с)	122.1	5.96 (с)	103.9
4	-	117.8	-	116.1
5	8.15 (д, 2.2 Гц)	132.3	7.70 (д, 2.4 Гц)	129.9
6	-	124.7	-	126.5
7	-	160.4	-	158.4
8	6.95 (д, 8.5 Гц)	116.9	6.86 (д, 8.5 Гц)	116.4
9	7.82 (дд, 2.2 и 8.5 Гц)	135.4	7.35 (дд, 2.4 и 8.5 Гц)	134.0
10	-	174.9	-	174.3
11	3.71 (с)	58.6	3.69 (с)	55.6

## 2. Синтез и свойства природного аналога люциферина AsLn2.

Помимо мажорного соединения CompX из люциферин-содержащей фракции экстракта биомассы червя *F. heliota* при помощи метода ионообменной хроматографии группе Петушкова удалось выделить около 0.1 мг чистого аналога люциферина, названного AsLn2. Спектры абсорбции люциферина и AsLn2 были сходными (Таблица 2). AsLn2 также обладал схожими с люциферинем флуоресцентными свойствами (Таблица 2), с максимумами эмиссии лежащими в видимой области спектра.

Таблица 2. Длины волн поглощения и максимумы флуоресцентной эмиссии AsLn2 и люциферина *Fridericia heliota* при различных значениях pH.

Соединение	Поглощение		Флуоресценция	
	$\lambda_{\max}$ , нм (локальный)	$\lambda_{\max}$ , нм	$\lambda_{\text{excitation}}$ , нм	$\lambda_{\text{emission}}$ , нм
люциферин pH 7.0	228	294	290	466
AsLn2 pH 4.0	226	294	330	446
AsLn2 pH 2.8	226	294	290	464

Масс-спектры высокого разрешения очищенного природного AsLn2, выявили протонированный молекулярный ион с  $m/z$  530.21296, соответствующей молекулярной формулой к которому является  $C_{26}H_{32}N_3O_9^+$ , (расчетное  $m/z$  530.21385). Для установления структуры AsLn2 Максимом Дубинным (ИБХ РАН) был получен ряд следующих ЯМР спектров:  $^1H$ ,  $^{13}C$ ,  $^1H$ - $^1H$  COSY,  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC,  $^1H$ - $^{13}C$  HMBC и  $^1H$ - $^{15}N$  HMBC. Анализ данных  $^1H$  ЯМР-спектроскопии выявил наличие в структуре пяти сигналов, сходных с сигналами CompX. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что карбоксильные группы CompX вовлечены в образование пептидных связей с аминогруппами остатков лизина и тирозина. Полученные данные ЯМР и масс-спектрометрии наилучшим образом соответствовали структуре (Z)-2-амино-6-(5-(3-((1-карбокси-2-(4-гидроксифенил)этил)амино)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибенамидо)гексановой кислоты (**2.3**). (Рис. 3). Это предположение было подтверждено встречным синтезом.

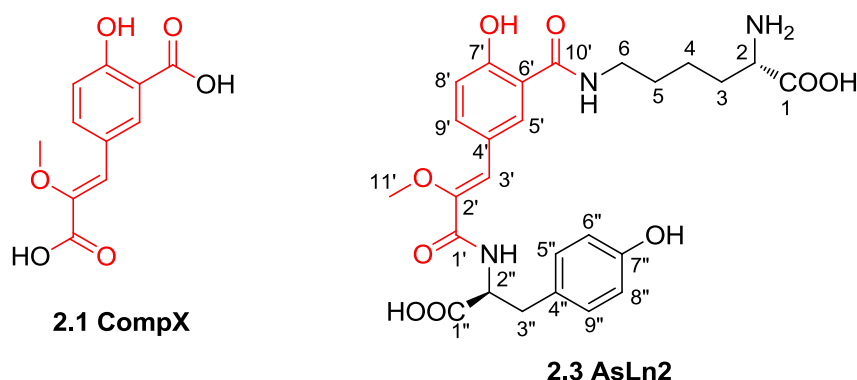


Рисунок 3. Структура AsLn2 с нумерацией атомов углерода согласно Таблице 3.

Синтез соединения AsLn2 описан на Схеме 2. Метилловый эфир CompX (**2.2**) был последовательно введен в конденсации с L-лизинном и L-тирозином с использованием

стандартных нерацемизирующих методов пептидного синтеза. *N*-Boc- и *O*-трет-бутил- защитные группы использовались для защиты лизина, что позволило осуществить их одновременное снятие в один этап, применив HBr в ледяной уксусной кислоте. Последним этапом в синтезе AsLn2 был щелочной гидролиз метилового эфира, использованного для защиты карбоксильной группы тирозина. Предложенный нами пятистадийный метод синтеза позволил получить аналог люциферина AsLn2 с выходом 14%.

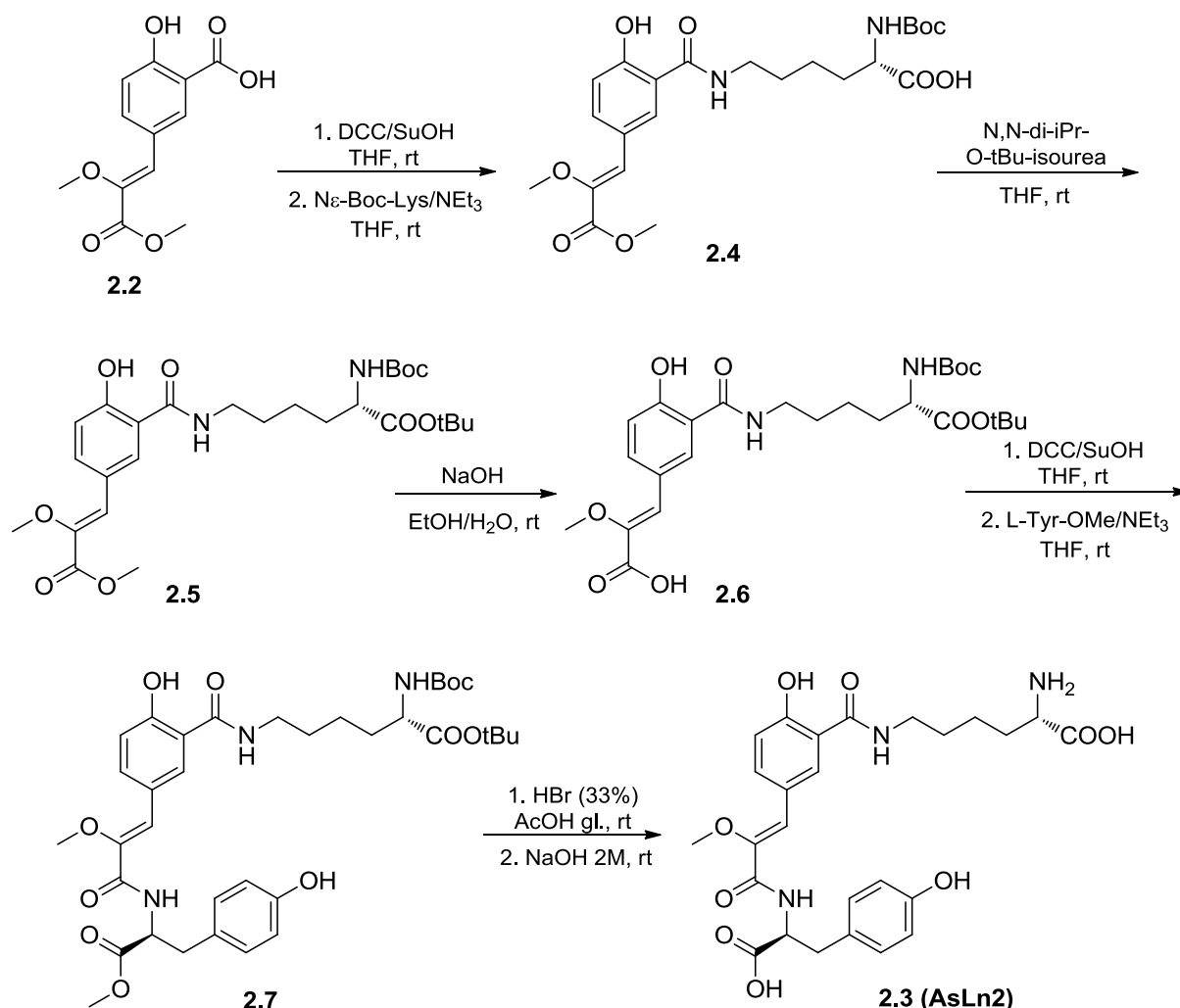


Схема 2. Синтез аналога люциферина AsLn2 (2.3).

Молекула AsLn2 содержит два асимметрических атома углерода и может иметь четыре различные стереохимические конфигурации. Хроматографические характеристики HPLC и спектральные данные ЯМР ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  химические сдвиги, мультиплетности) продукта последней стадии синтеза оказались абсолютно идентичны природному образцу, что позволило предположить идентичность порядка химических связей и относительной стереохимии двух молекул. Количество природного AsLn2 было недостаточным для точного определения величины оптического вращения молекулы, однако абсолютная стереохимия аналога люциферина AsLn2 была определена при помощи хирального ВЭЖХ-анализа природного и синтетического соединений, времена удерживания которых были практически идентичны. Полученные данные позволили предположить L-конфигурацию обоих стереоцентров в молекуле AsLn2 и, таким образом, его структура была окончательно определена как (S)-2-амино-6-(5-((Z)-3-(((S)-1-

карбокси-2-(4-гидроксифенил)этил)амино)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)гексановая кислота.

**Таблица 3. Химические сдвиги  $^1\text{H}$  (600 МГц) и  $^{13}\text{C}$  (150 МГц) и мультиплетности сигналов протонов природного AsLn2 в  $\text{D}_2\text{O}$  при pH 7.0 и 30 °С.**

Фрагмент и нумерация атомов углерода		$^1\text{H}$ химические сдвиги и мультиплетности сигналов и $^{13}\text{C}$ химические сдвиги		
			$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
Лизин	1	-		174.70
	2	3.724	дд (5.6 Гц, 6.8 Гц)	54.77
	3	1.928, 1.875	м, м	30.19
	4	1.463	м	22.02
	5	1.666	квинт (7.2 Гц)	28.21
	6	3.411	т (7.0 Гц)	39.09
СompX	1'	- <sup>a</sup>		165.40
	2'	-		146.09
	3'	6.744	с	120.19
	4'	-		117.81
	5'	7.970	д (1.7 Гц)	130.66
	6'	-		123.41
	7'	-		<sup>a</sup>
	8'	6.951	д (8.7 Гц)	118.54
	9'	7.743	дд (1.7 Гц, 8.7 Гц)	134.77
	10'	-		169.41
	11'	3.467	с	59.27
Тирозин	1''	-		177.79
	NH	<sup>a</sup>		$^{15}\text{N}$ : 121.24
	2''	4.533	дд (5.1 Гц, 8.2 Гц)	56.24
	3''	3.228	дд (5.1 Гц, 14.1 Гц)	36.72
		2.973	дд (8.2 Гц, 14.1 Гц)	
	4''	-		129.49
	5'', 9''	7.144	д (8.4 Гц)	130.59
	6'', 8''	6.824	д (8.4 Гц)	115.30
7''	-		154.12	

<sup>a</sup> Не наблюдается

### 3. Синтез и свойства люциферина червя *Fridericia heliota*.

Общее количество люциферина, выделенного из 70 г биомассы червя составило лишь 0.005 мг. Столь малое количество люциферина позволило провести лишь ограниченный ряд спектральных исследований. Из  $^1\text{H}$ , COSY и частичного  $^{13}\text{C}$ -HSQC ЯМР спектров, полученных Максимом Дубинным (ИБХ РАН), в совокупности с HRMS масс-спектрометрическими данными следовало, что молекула люциферина состоит из четырех фрагментов: остатков CompX, лизина, гамма-аминомасляной (ГАМК) и щавелевой кислот (Рис. 4).

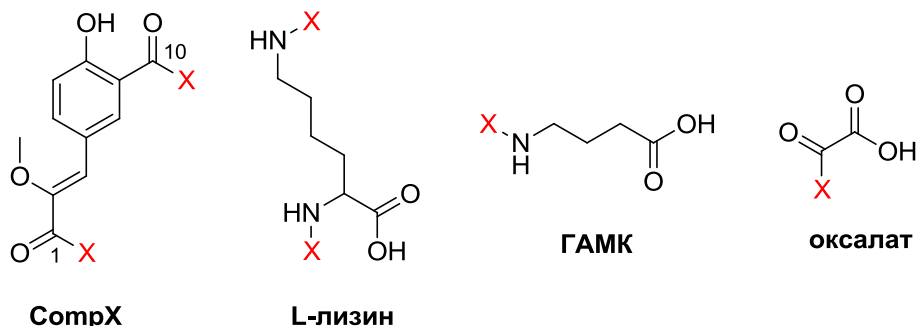


Рисунок 4. Фрагменты люциферина *F. heliota*.

Четыре изомерных структуры 2.8-2.11 (Рис. 5) соответствовали данным ЯМР и масс-спектров. Эти изомеры различались лишь порядком пептидных связей, соединяющих четыре остатка являющихся структурными элементами люциферина *F. heliota*: CompX, лизин, ГАМК и оксалат. В синтезе всех четырех соединений использовались производные L-лизина и предотвращающие рацемизацию методы образования пептидных связей.

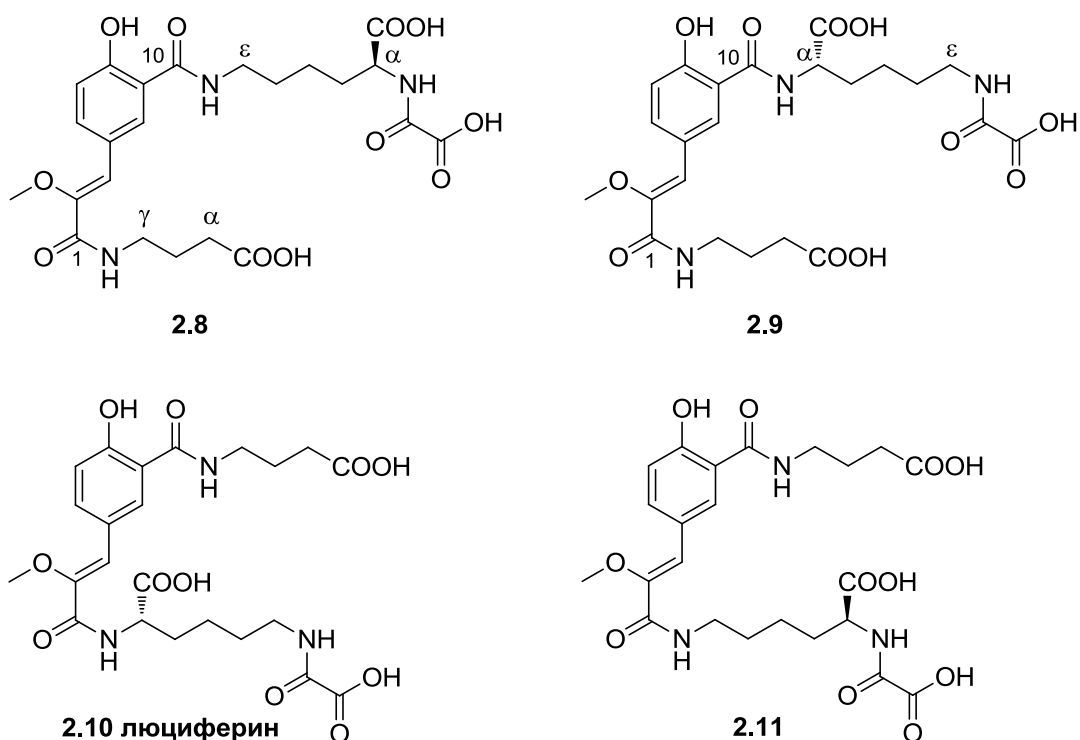


Рисунок 5. Четыре возможные изомерные структуры люциферина *F. heliota*

Основываясь на структуре расшифрованного и синтезированного нами ранее аналога люциферина AsLn2 (**2.3**), имеющего в своем составе фрагмент L-лизина, связанный с атомом углерода C10 фрагмента CompX, мы предположили, что лизин в молекуле люциферина также находится в этом положении, тогда как фрагмент гамма-аминомасляной кислоты вероятнее всего связан с C1 карбоксильной группой (Рис. 5). Для проверки этой версии мы синтезировали изомер люциферина **2.8** - (S,Z)-2-(карбоксиформамидо)-6-(5-(3-((3-карбоксипропил)амино)-2-метокси-3-оксипроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)гексановая кислота из монометилового эфира CompX **2.2** с использованием стандартных методов пептидного синтеза (Схема 3).

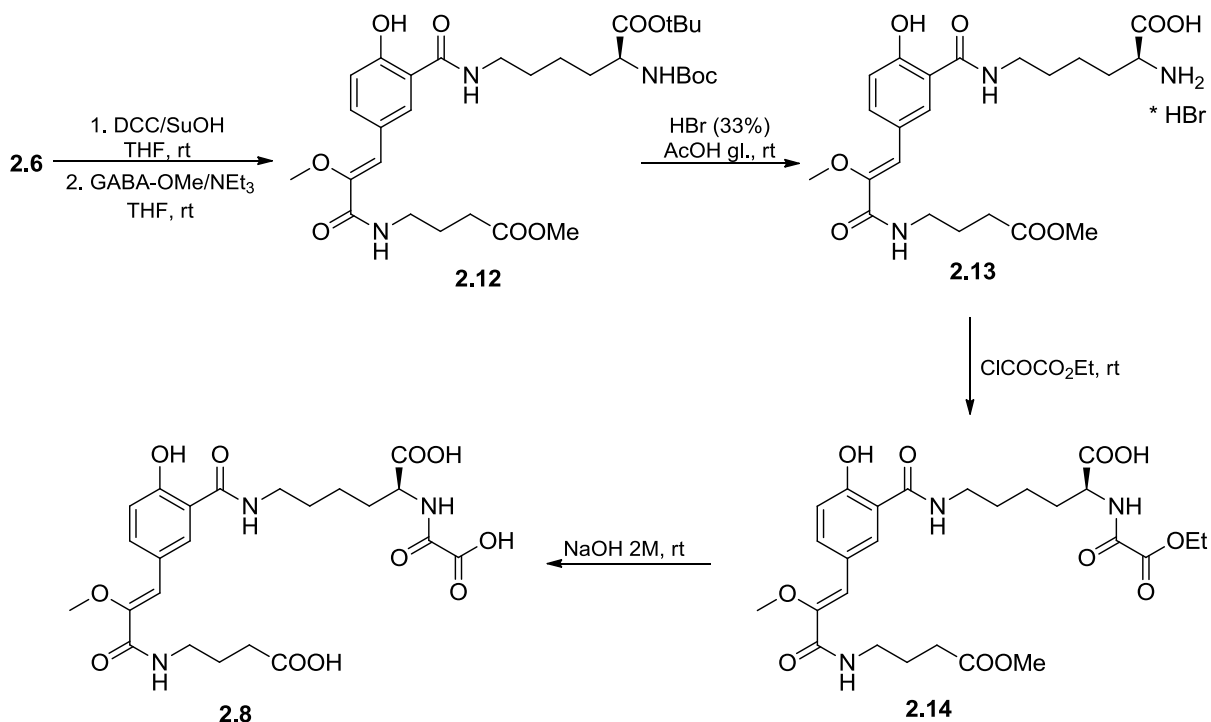


Схема 3. Синтез изомера люциферина **2.8** по аналогии с AsLn2.

Спектры ЯМР синтетического соединения **2.8** затем сравнили со спектрами природного люциферина, однако химические сдвиги протонов синтетического изомера люциферина **2.8** оказались близкими, но не идентичными химическим сдвигам протонов природного люциферина. Более того, соединение **2.8** не проявило люминесцентной активности при добавлении к неочищенной люциферазе *F. heliota*, в присутствии АТФ и ионов Mg<sup>2+</sup>.

Аналогично были синтезированы оставшиеся три изомерных пептида **2.9-2.11**, спектры ЯМР которых сравнили со спектрами природного люциферина. Синтез также начинали с монометилового эфира CompX (Схемы 4 - 6). Все полученные соединения обладали сходными спектральными характеристиками ЯМР в D<sub>2</sub>O при pH 5.0. Однако только для соединения **2.10** - (S,Z)-6-(карбоксиформамидо)-2-(3-(3-((3-карбоксипропил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексановой кислоты наблюдались химические сдвиги и мультиплетности сигналов в спектрах <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C, полностью соответствующие химическим сдвигам и мультиплетностям сигналов атомов природного люциферина (Рис. 7, Таблица 4).

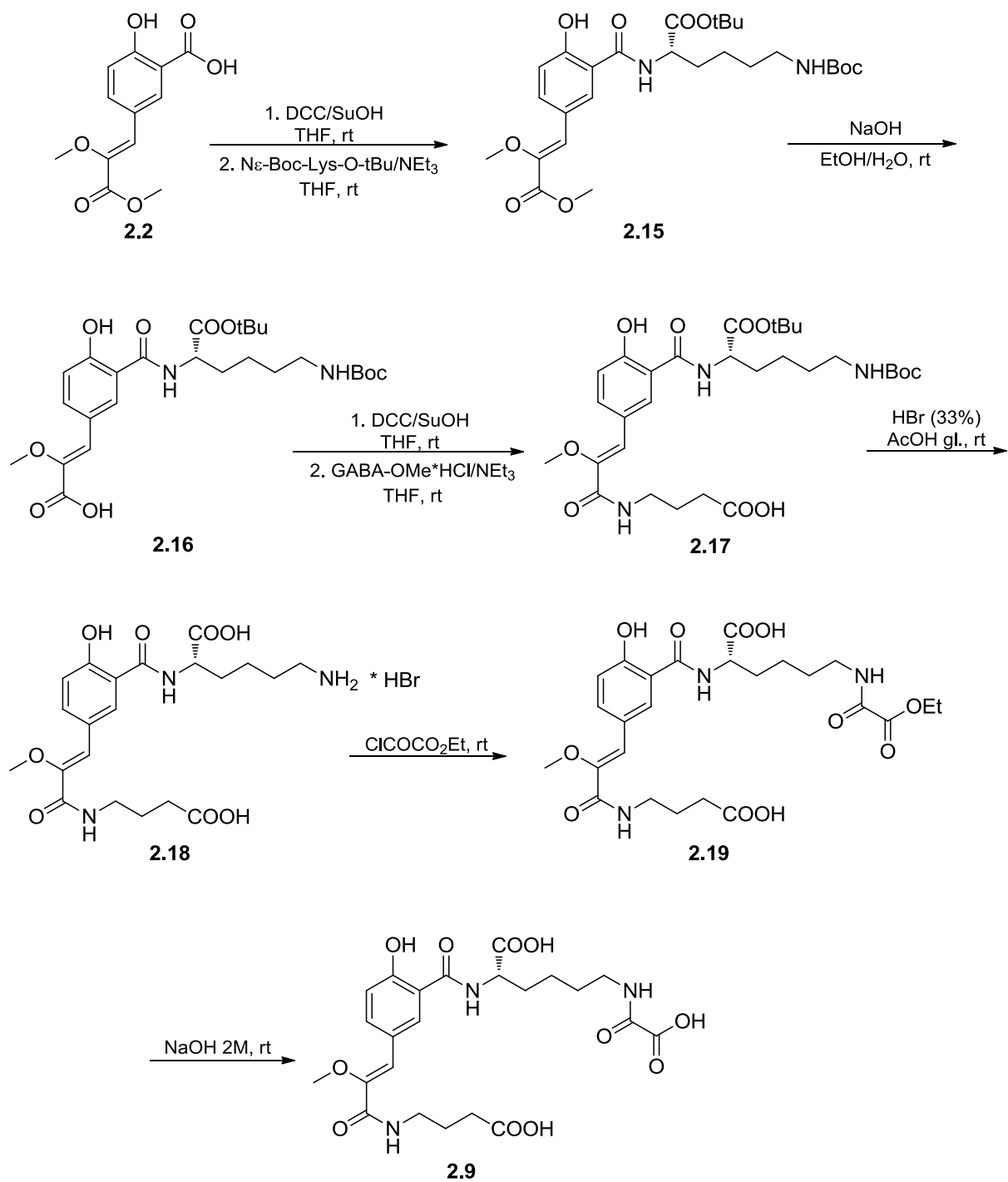


Схема 4. Синтез изомера люциферина 2.9 из монометилового эфира ComrX

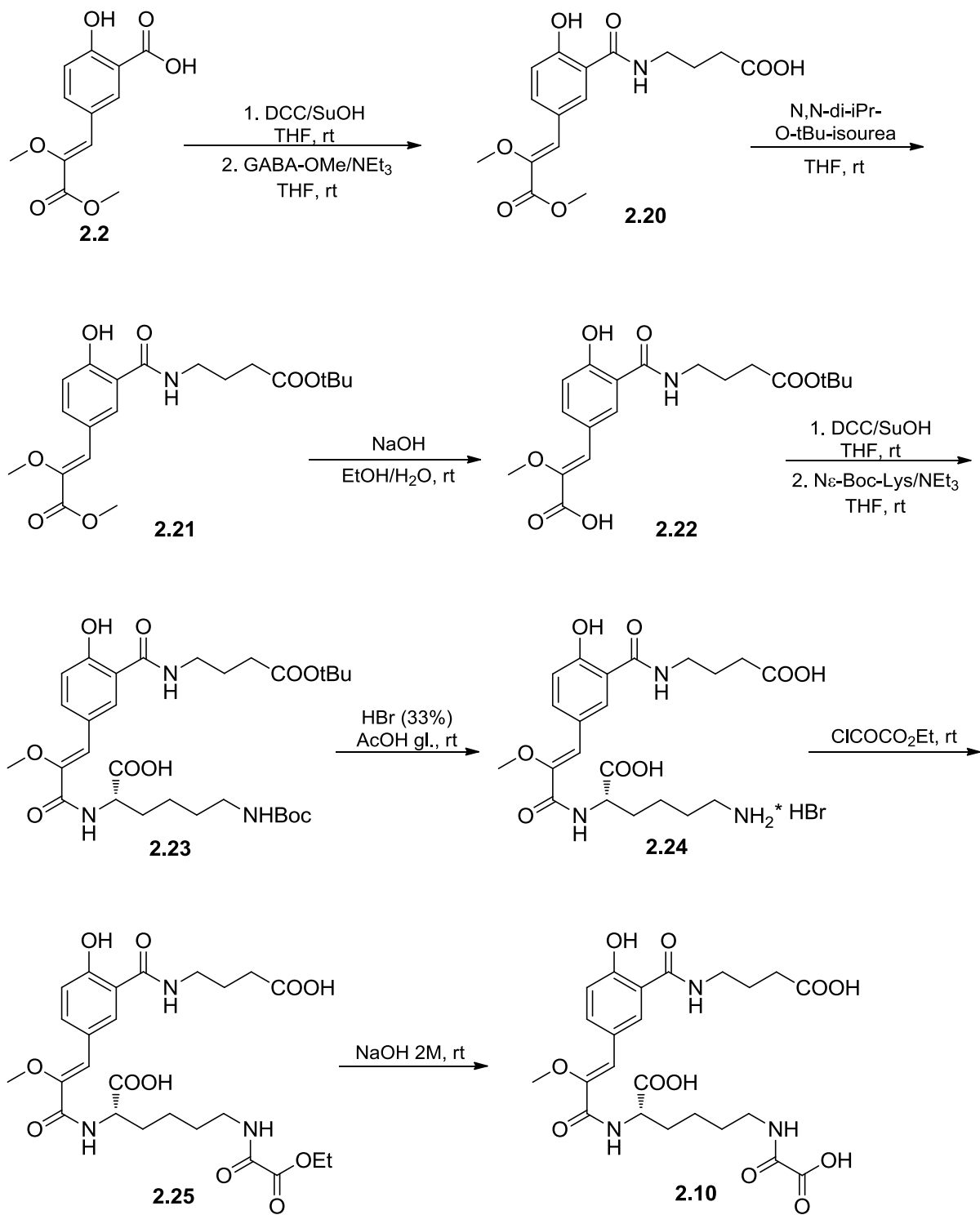


Схема 5. Синтез люциферина *F. heliota* 2.10



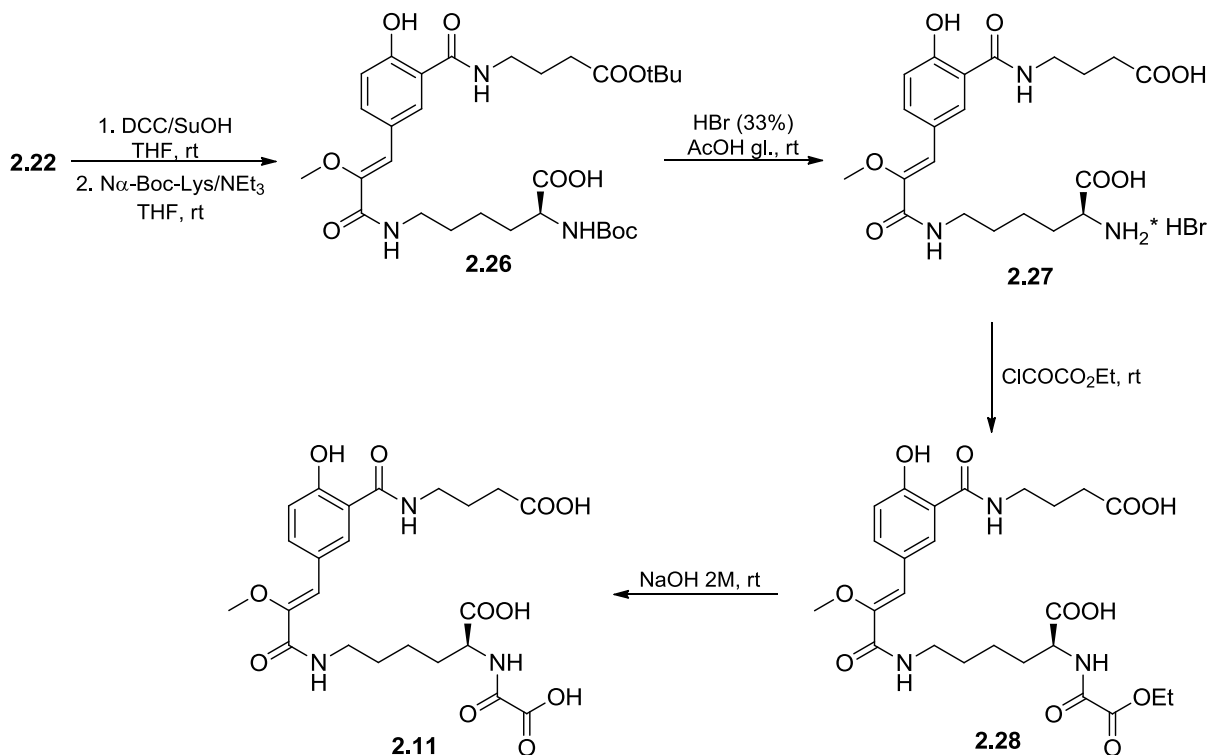


Схема 6. Синтез изомера люциферина 2.11

Нами также была исследована способность соединений **2.9-2.11** к испусканию света при добавлении к неочищенной люциферазе *F. heliota* в присутствии АТФ и MgSO<sub>4</sub>. В этих условиях люминесцентные свойства были обнаружены только у соединения **2.10**, спектр люминесценции (Рис. 6) и зависимость интенсивности свечения от концентрации которого оказались идентичны природному люциферину (Рис. 8).

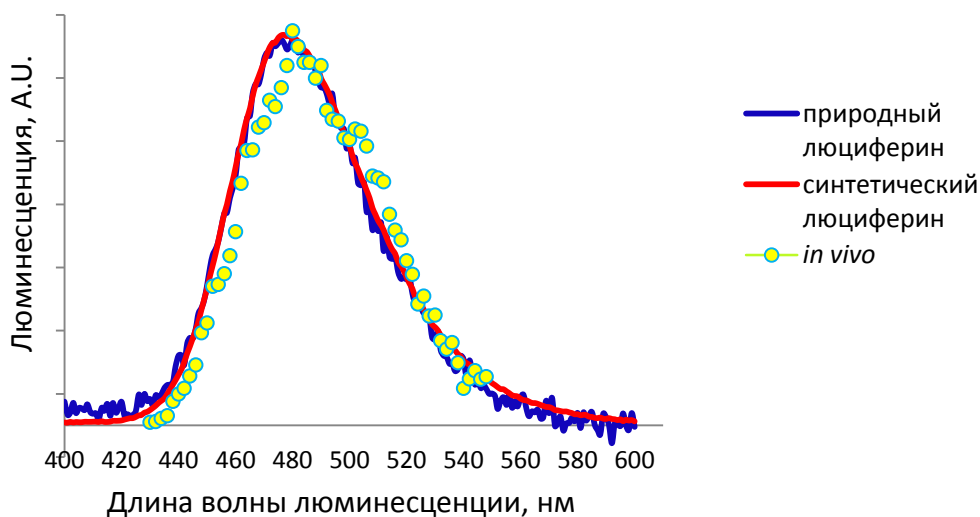


Рисунок 6. Спектры люминесценции природного и синтетического люциферинов.

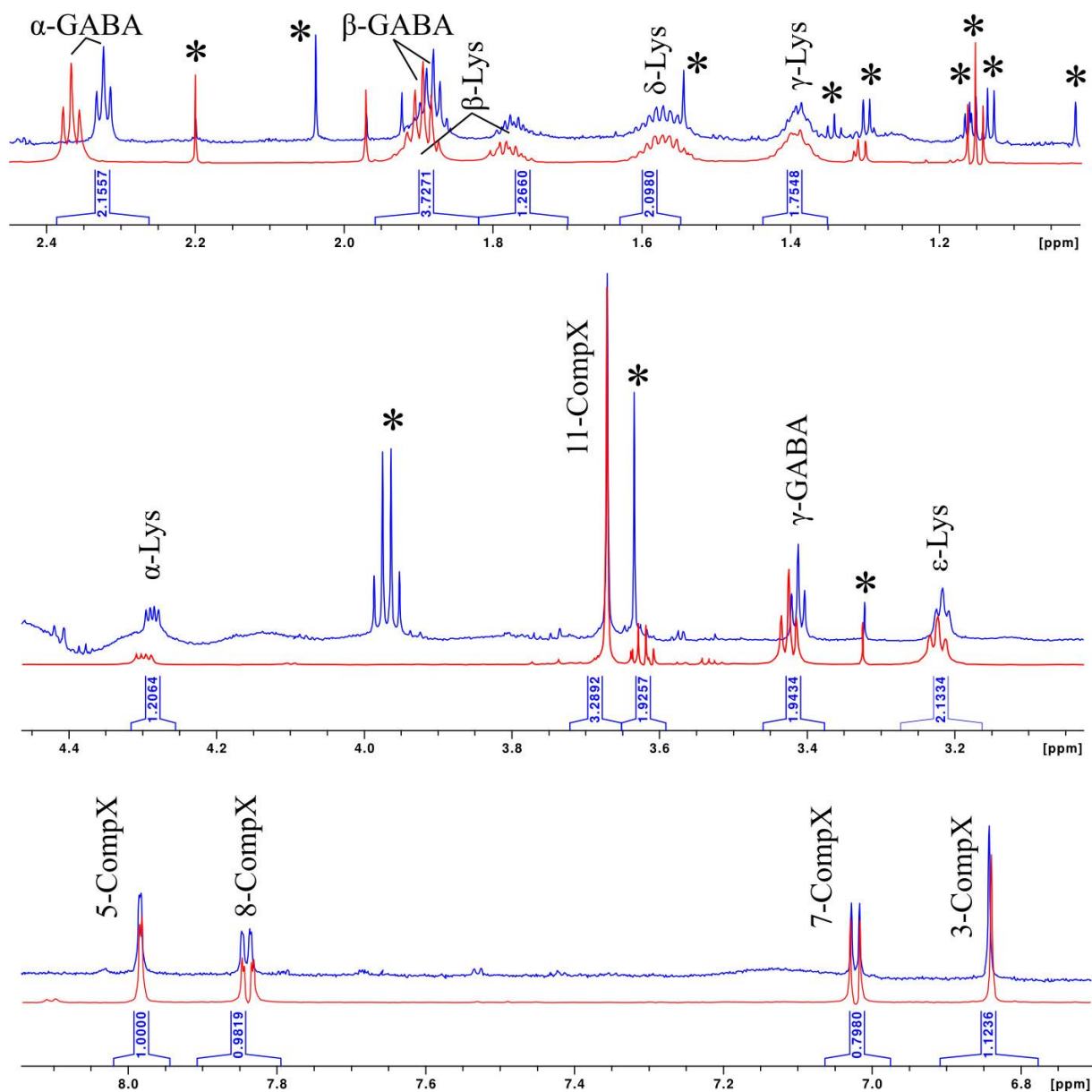


Рисунок 7. Совпадение химических сдвигов протонов в ЯМР  $^1\text{H}$  спектрах природного (синий) и синтетического (красный) люциферина в  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$  при pH 5.0. Примеси отмечены звездочками

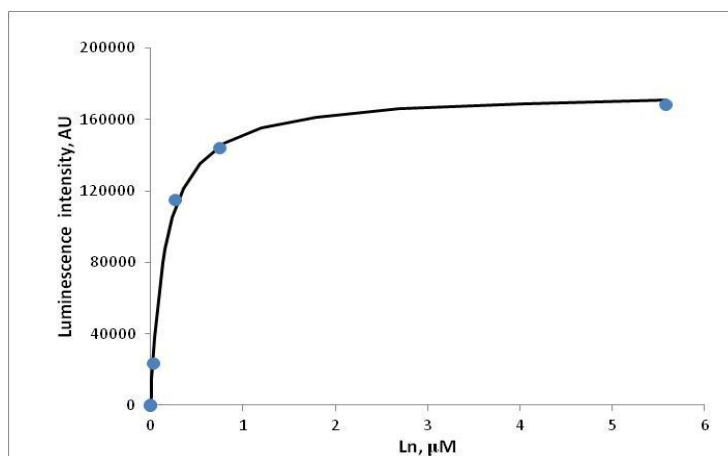


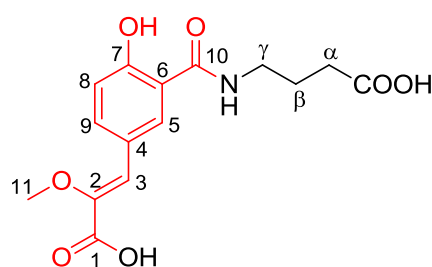
Рисунок 8. Зависимость интенсивности свечения люциферазы *F. heliota* от концентрации синтетического люциферина 2.10, в присутствии АТФ и  $\text{MgSO}_4$ .

**Таблица 4. ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  химические сдвиги ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 5,0$ ) люциферина *Fridericia* и синтетических соединений 2.8-2.11.**

		<i>Fridericia luciferin</i>		<b>2.10</b>		<b>2.11</b>		<b>2.8</b>		<b>2.9</b>	
		$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
ГАМК	CO		n.o.		180.50		180.64		180.85		180.48
	$\alpha$	2.324	n.o.	2.361	33.19	2.350	33.28	2.312	33.49	2.330	33.20
	$\beta$	1.879	24.93	1.890	24.75	1.884	24.97	1.841	24.96	1.850	24.83
	$\gamma$	3.410	39.18	3.422	39.17	3.413	39.19	3.334	39.17	3.346	39.10
CompX	1		n.o.		165.89		166.23		166.35		166.40
	2		146.97		146.97		147.11		146.96		147.00
	3	6.844	119.82	6.840	119.88	6.796	119.62	6.811	119.84	6.857	119.85
	4		n.o.		117.54		117.51		117.79		117.76
	5	7.983	130.29	7.981	130.31	7.950	130.27	7.950	130.33	8.116	130.92
	6		n.o.		124.94		124.93		124.85		124.98
	7		n.o.		157.61		157.54		157.39		157.21
	8	7.022	117.58	7.022	117.65	7.006	117.64	6.992	117.60	7.070	117.61
	9	7.841	134.92	7.838	134.97	7.807	134.91	7.766	134.88	7.792	135.12
	10		n.o.		169.57		169.52		169.20		168.28
Лизин	CO		n.o.		175.80 <sup>a)</sup>		178.52		178.55		178.90
	$\alpha$	4.288	55.13	4.297	55.12	4.171	55.03	4.176	55.10	4.399	55.35
	$\beta$	1.895 1.769	31.30	1.901 1.776	31.31	1.861 1.746	31.41	1.874 1.767	31.45	1.930 1.831	31.29
	$\gamma$	1.388	22.66	1.390	22.78	1.376	22.52	1.415	22.60	1.425	22.59
	$\delta$	1.566	27.83	1.572	27.97	1.587	28.19	1.631	28.12	1.587	28.04
	$\epsilon$	3.217	39.25	3.222	39.30	3.308	39.30	3.377	39.48	3.215	39.30
Оксалат	CO		n.o.		n.o.		164.29		164.33		165.08
	CO <sub>2</sub> H		n.o.		n.o.		170.82		170.82		170.77

#### 4. Синтез и свойства природного аналога люциферина AsLn7

Предположительно, CompX является биосинтетическим прекурсором люциферина, в то время как биологическая роль AsLn2 остается неясной, в силу малого структурного сходства между молекулами аналога и самого люциферина. Возможно, этот пептид является побочным продуктом в биосинтезе люциферина *Fridericia* в результате неселективного присоединения фрагмента CompX к L-тироzinу и  $\epsilon$ -аминогруппе L-лизина вместо  $\gamma$ -аминомасляной кислоты и  $\alpha$ -аминогруппы L-лизина, соответственно. Помимо соединений CompX и AsLn2 нами была расшифрована структура еще одного аналога люциферина – модифицированного пептида, названного AsLn7 (2.29, Рис. 9). Было установлено, что молекула этого соединения состоит из двух структурных фрагментов: гамма-аминомасляной кислоты и CompX – что позволило предположить, что этот дипептид является прекурсором в биосинтезе люциферина.

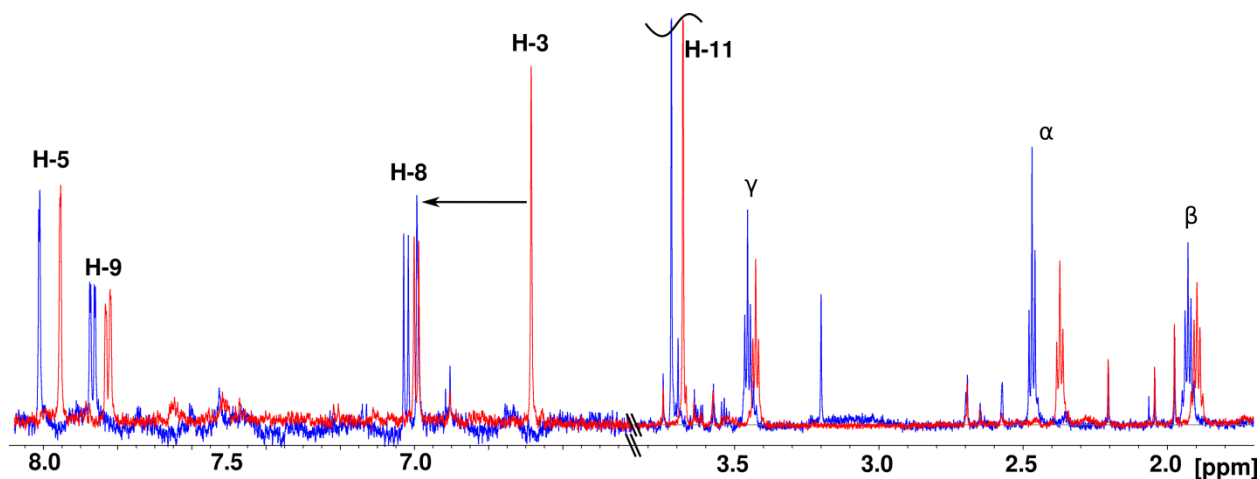


2.29 AsLn7

Рисунок 9. Структура аналога люциферина *Fridericia heliota* AsLn7.

Как и для аналогов CompX и AsLn2, спектры абсорбции и флуоресцентной эмиссии аналога AsLn7 оказались схожими с люциферинном *Fridericia*. Масс-спектры высокого разрешения очищенного природного AsLn7 выявили протонированный молекулярный ион с  $m/z$  324.1068, соответствующей молекулярной формулой к которому является  $C_{15}H_{18}NO_7^+$  (расчетное  $m/z$  324.1078). Малое количество природного AsLn7 (~40 мкг) позволило получить лишь протонные DQF-COSY и  $^1H, ^{13}C$ -HSQC ЯМР спектры в  $D_2O$ . Анализ полученных Максимом Дубинным ЯМР спектров выявил наличие в структуре AsLn7 короткой алифатической цепи ( $CH_2-CH_2-CH_2$ ) с химическими сдвигами в протонном и углеродном спектрах, характерными для гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), и четырех протонов, химические сдвиги и мультиплетности которых были сходны с сигналами CompX. Полученные данные позволили нам предположить что AsLn7 является пептидом, образованным аминокислотой ГАМК и одним из двух карбоксильных групп фрагмента CompX.

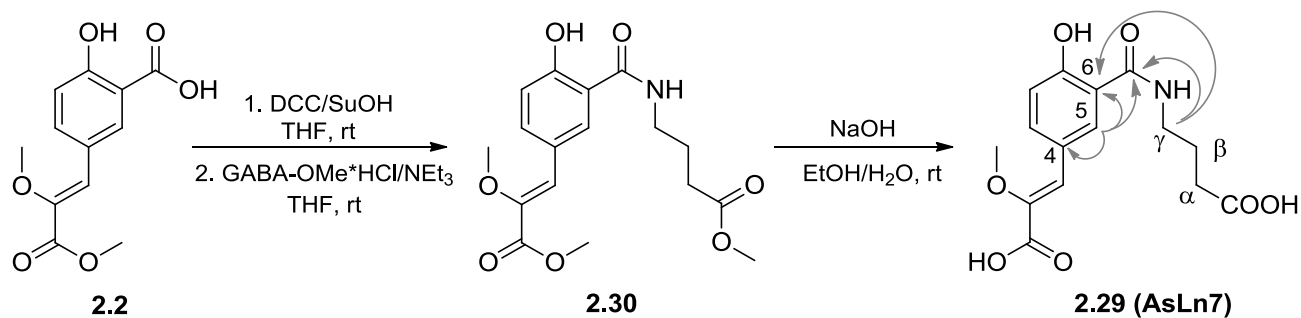
Точное расположение пептидной связи было установлено при помощи эксперимента ЯМР-титрования в области pH 3.0 ÷ 5.0, проведенного Максимом Дубинным (Рис. 10).



**Рисунок 10.**  $^1\text{H}$  ЯМР спектр природного AsLn7 в  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$  при pH 5.0 (синий) и 3.0 (красный). Нумерация атомов согласно Рисунку 9.

При помощи ЯМР-титриметрического анализа удалось установить, что протон H3 обладает значительной чувствительностью к изменению pH ( $\Delta$ м.д. 0.31), в то время как химический сдвиг сигнала протона H5 изменяется в значительно меньшей степени ( $\Delta$  м.д. 0.06). Полученные данные позволили предположить, что C1 карбоксильная группа свободна, тогда как карбоксил C10 образует пептидную связь с фрагментом ГАМК. Более того, химические сдвиги протонов  $\alpha\text{-CH}_2$  группы гамма-аминомасляной кислоты также обладали чувствительностью к pH, что свидетельствует о том, что карбоксильная группа этого фрагмента также является незамещенной. (Рис. 10).

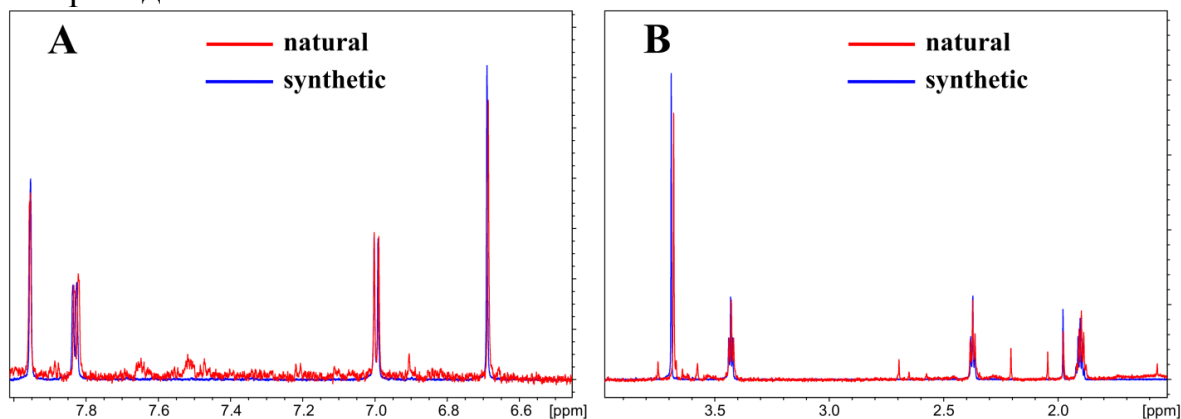
Для подтверждения предположительной структуры AsLn7 нами был предпринят двухстадийный синтез молекулы. На первом этапе синтеза была проведена конденсация метилового эфира CompX 2.2 с метиловым эфиром гамма-аминомасляной кислоты, за которой последовал основной гидролиз сложноэфирных групп, использованных для защиты карбоксильных групп CompX и ГАМК (Схема 7).



**Схема 7.** Синтез аналога люциферина AsLn7. Основные HMBC кросс-пики в синтетическом AsLn7.

ЯМР-исследование синтетического образца AsLn7 ( $\text{D}_2\text{O}$ , pH 5.0) выявило полное совпадение его химических сдвигов и мультиплетностей с природным образцом, таким образом полностью подтверждая предложенное строение AsLn7 (Рис. 11). Более того, идентичность синтетического и природного образцов была также подтверждена при помощи полного набора одно- и двумерных ЯМР экспериментов:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$ -HSQC,  $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$ -HMBC and DQF-COSY. Необходимо заметить, что анализ наблюдаемых кросс-пиков в HMBC спектре синтетического AsLn7 между

протонами  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> гамма-аминомасляной кислоты и углеродом C6 заставил нас присвоить уточненные химические сдвиги углеродным сигналам фрагмента CompX C4 (126.1 м.д.) и C6 (117.3 м.д.), ошибочно определенные нами ранее для синтетических изомеров люциферина и его аналога AsLn2. Данные ЯМР синтетического AsLn7 приведены в Таблице 5, основные кросс-пики в спектрах HMBC приведены на Схеме 7.



**Рисунок 11.** Химические сдвиги протонов в ЯМР <sup>1</sup>H спектрах природного (красный) и синтетического (синий) AsLn7 в D<sub>2</sub>O, 30°C при pH 5.0.

**Таблица 5.** <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C химические сдвиги и мультиплетности протонов синтетического AsLn7 (700 МГц, D<sub>2</sub>O, 30°C, pH 5.0). Нумерация атомов согласно Рисунку 2.12.

Номер атома	$\delta_H$ , мультиплетности. (J, Гц)	$\delta_C$
1	-	171.6
2	-	149.5
3	6.69, с	118.7
4	-	126.1
5	7.96, д (2.2 Гц)	129.7
6	-	117.3
7	-	156.9
8	7.00, д (8.5 Гц)	117.5
9	7.83, дд (8.5, 2.2 Гц)	134.6
10	-	169.7
11	3.69, с	58.4
$\gamma$ -ГАМК	3.42, т (7.2 Гц)	39.2
$\beta$ -ГАМК	1.90, квинт (7.5 Гц)	24.8
$\alpha$ -ГАМК	2.37, т (7.8 Гц)	33.1
1-ГАМК	-	180.6

## 4.2 Обсуждение

Таким образом, мы представляем структуру нового люциферина – ключевого компонента новой АТФ-зависимой биолюминесцентной системы сибирского почвенного червя *Fridericia heliota*, обладающей принципиально новым химическим механизмом люминесценции. Предположительно, в ходе реакции люминесценции происходит окисление одной из трех свободных карбоксильных групп люциферина, в то время как флуоресцентный остаток CompX отвечает за испускание квантов света. Роль фрагмента CompX в качестве люминофора подтверждается близким сходством спектров флуоресценции люциферина со спектром биолюминесценции *Fridericia heliota* ( $\lambda_{\text{max}}$  466 и 480 нм, соответственно).

Ни один из синтезированных нами природных аналогов люциферина *F. heliota* (CompX, AsLn2 и AsLn7) не проявляет способности к биолюминесценции. Структуры вновь выявленных соединений позволяют предположить, что они могут являться неактивными аналогами люциферина – его предшественниками или продуктами деградации.

Точная биологическая функция соединения AsLn2 остается пока неясной. С одной стороны можно предположить, что это соединение является побочным продуктом биосинтеза люциферина *Fridericia heliota*, причиной появления которого является неселективная конденсация молекулы CompX с L-лизином, при которой происходит образование пептидной связи между карбоксильной группой CompX и  $\epsilon$ -амино группой L-лизина, вместо  $\gamma$ -амино группы гамма-аминомасляной кислоты. С другой стороны, присутствие большого количества CompX и его амидов в биомассе червя также позволяет предположить, что эти соединения несут защитную функцию в организме.

Наличие в биомассе червя аналога люциферина AsLn7, в структуру которого входят два из четырех структурных фрагментов люциферина: CompX и ГАМК - позволяет предположить, что путь биосинтеза люциферина *Fridericia heliota* протекает через последовательное присоединение четырех его фрагментов: ГАМК, CompX, L-лизина и щавелевой кислоты при участии специфических или неспецифических аминокислотных лигаз (Рис. 12).

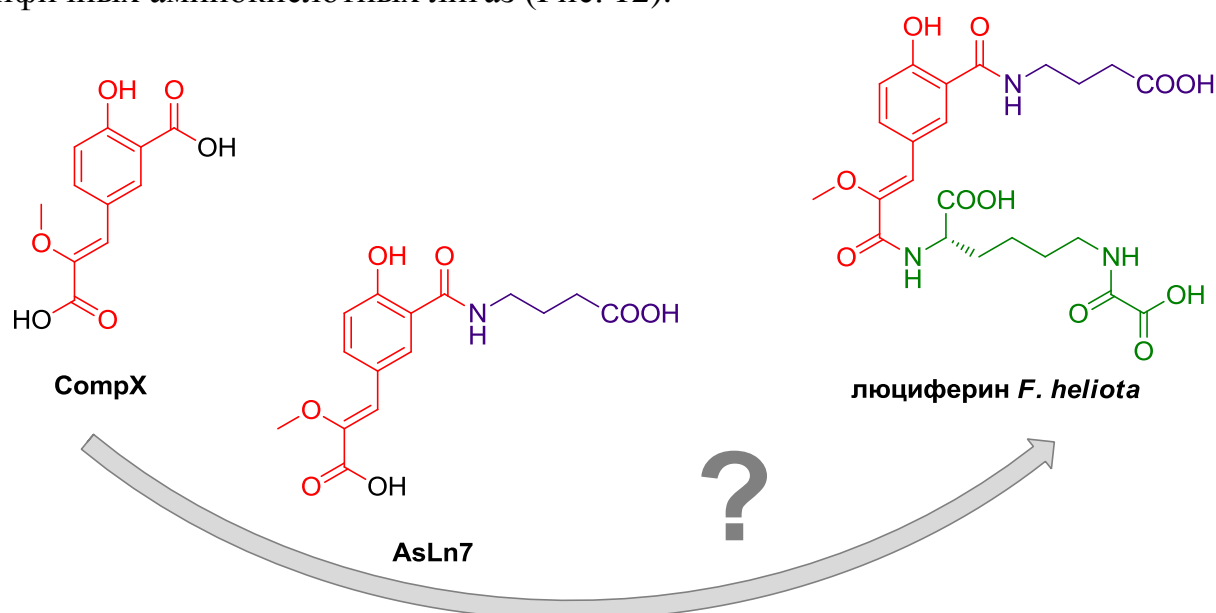


Рисунок 12. Возможный путь биосинтеза люциферина *Fridericia heliota*.

## ВЫВОДЫ

1. Методом встречного синтеза установлено строение нового природного люциферина – субстрата АТФ-зависимой билюминесцентной системы почвенного червя *Fridericia heliota*: (S,Z)-6-(карбоксихформамидо)-2-(3-(3-((3-карбоксихпропил)карбамоил)-4-гидрохифенил)-2-метохсиакриламидо)гексановой кислоты.
2. Впервые разработан метод синтеза CompX – природного аналога люциферина люминесцентного почвенного червя *Fridericia heliota*. Методом встречного синтеза подтверждено строение CompX – (Z)-5-(2-карбоксих-2-метохсивинил)-2-гидрохисбензойной кислоты, в частности, установлена конфигурация трехзамещенной двойной связи.
3. Разработан метод синтеза AsLn2 – природного аналога люциферина люминесцентного почвенного червя *Fridericia heliota*. Методом встречного синтеза подтверждено строение AsLn2 – (S)-2-амино-6-(5-((Z)-3-(((S)-1-карбоксих-2-(4-гидрохисфенил)этил)амино)-2-метохсих-3-охсопроп-1-ен-1-ил)-2-гидрохисбензамидо) гексановой кислоты, в частности, установлены относительные и абсолютные конфигурации стереоцентров.
4. Разработан метод синтеза AsLn7 – природного аналога люциферина люминесцентного почвенного червя *Fridericia heliota*. Методом встречного синтеза подтверждено строение AsLn7 – ((Z)-4-(5-(2-карбоксих-2-метохсивинил)-2-гидрохисбензамидо)бутановой кислоты.



## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи

1. Petushkov V.N., Dubinnyi M.A., **Tsarkova A.S.**, Rodionova N.S., Baranov M.S., Kublitski V.S., Shimomura O., Yampolsky I.V. A novel type of luciferin from the Siberian luminous earthworm *Fridericia heliota*: structure elucidation by spectral studies and total synthesis. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014. Т. 53. № 22. С. 5566–5568.
2. Petushkov V.N., **Tsarkova A.S.**, Dubinnyi M.A., Rodionova N.S., Marques S.M., Esteves da Silva J.C.G., Shimomura O., Yampolsky I.V. CompX, a luciferin-related tyrosine derivative from the bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*. Structure elucidation and total synthesis // *Tetrahedron Lett.* 2014. Т. 55. № 2. С. 460–462.
3. **Tsarkova A.S.**, Dubinnyi M.A., Baranov M.S., Petushkov V.N., Rodionova N.S., Zagudaylova M.B., Yampolsky I.V. Total synthesis of AsLn2 – a luciferin analogue from the Siberian bioluminescent earthworm *Fridericia heliota* // *Mendeleev Commun.* 2015. Т. 25. № 2. С. 99–100.
4. Dubinnyi M.A., **Tsarkova A.S.**, Petushkov V.N., Kaskova Z.M., Rodionova N.S., Kovalchuk S.I., Ziganshin R.H., Baranov M.S., Mineev K.S., Yampolsky I.V. Novel peptide chemistry in terrestrial animals: natural luciferin analogues from the bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*. // *Chem. Eur. J.* 2015. Т. 21. № 10. С. 3942–3947.

### Тезисы докладов на конференциях

1. **Царькова А.С.** Синтез люциферина сибирского люминесцентного червя *Fridericia heliota* и его аналогов. // Материалы XXVI Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – М: ИБХ РАН - 2014, С. 120.
2. **Царькова А.С.** Разработка новой биолюминесцентной аналитической системы на основе люциферина сибирского люминесцентного червя *Fridericia heliota*. // Материалы весеннего финала по программе «У.М.Н.И.К.» РАН - 2014 – М: ИНБИ РАН - 2014, С. 78-79.
3. Petushkov, V.; Dubinnyi, M.; **Tsarkova, A.**; Rodionova, N.; Baranov, M.; Shimomura, O.; Yampolsky, I. A novel ATP-dependent bioluminescent system from the siberian earthworm *Fridericia heliota*: structure elucidation of luciferin and its analogs. // Abstracts of the 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence – *Luminescence* 2014, Т. 29, № S1, С. 54-55.